



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 52 700 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 52 700.0
㉔ Anmeldetag: 28. 11. 97
㉕ Offenlegungstag: 2. 6. 99

㉙ Int. Cl.⁶:
C 12 N 9/88
C 12 N 15/63
C 12 Q 1/527
// (C12N 9/88,C12R
1:19)A01N
57/20,A61K
31/66

DE 197 52 700 A 1

㉚ Anmelder:
Hoechst Schering AgrEvo GmbH, 13509 Berlin, DE

㉛ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉜ 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase, Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der
1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und Effektoren der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

DE 197 52 700 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (DXS), Verfahren zur Herstellung der DXS, die Verwendung der DXS, Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der DXS sowie Effektoren der DXS.

- 5 Isoprenoide stellen eine sehr umfangreiche Klasse von Naturstoffen dar und umfassen eine Vielzahl essentieller Verbindungen wie beispielsweise Carotinoide, Steroide, Prenylchinonseitenketten oder Phytolreste in Chlorophyllen (Coolbear & Threlfall, (1989) in *Biosynthesis of terpenoid lipids*, ed. Ratledge & Wilkinson, (Academic Press), pp. 115-254, Bach, T. J. (1995) *Lipids* 30, 191-202).

- Es wird postuliert, daß die Biosynthese des Isopentenylidiphosphats (IPP), dem C-5-Grundkörper aller Isoprenoide, über den Acetat-Mevalonat-Weg erfolgt (Banthorpe et al., (1972) *Chem. Rev.* 72, 115-155; Beyia & Porter, (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 113-142).

Vor kurzem wurde durch ¹³C-Markierungsversuche an Bakterien, Algen und Pflanzen die Existenz eines zum Acetat-Mevalonat-Weg alternativen Stoffwechselweges zum IPP nachgewiesen (Rohmer et al., (1993) *Biochem. J.* 295, 517-524; Rohmer et al., (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2564-2566).

- 15 Als erstes Zwischenprodukt dieses alternativen Isoprenoidbiosyntheseweges wurde 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) postuliert, das in einer Thiamindiphosphatabhängigen Reaktion aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) synthetisiert wird.

- Die DXS katalysiert den ersten Reaktionsschritt des alternativen, nicht Mevalonat-abhängigen Isoprenoidbiosyntheseweges, d. h. die Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P).

DXP bzw. 1-Desoxy-D-xylulose (DOX) sind außerdem an der Biosynthese von Thiamin (Vitamin B₁) und Pyridoxol (Vitamin B₆) beteiligt (Hill et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 30426-30435; Himmeldirk et al., (1996) *Chem. Commun.*, 1187-1188).

- Darüber hinaus wurde über die Klonierung und Charakterisierung des dxs-Gens aus *E. coli* sowie die Überexpression des dxs-Genprodukts in *E. coli* berichtet (Lois et al., (1997) Abstracts 3rd Terpnat Meeting on Plant Isoprenoids, p. 16, Universite de Poitiers, Frankreich). Die Bildung von DXP wurde mittels zellfreien Extrakten nachgewiesen.

Für das Enzym DXS aus *E. coli* wurde eine Thiamindiphosphat-Bindungsstelle postuliert, wie sie z. B. aus anderen Enzymen, wie Pyruvat-Decarboxylasen, Acetolactat-Synthasen oder Transketolasen bekannt ist.

- Ein Sequenzvergleich mit Sequenzinformationen auf Aminosäure-Ebene zeigte Homologien zu Genprodukten bisher unbekannter Funktion, so daß den folgenden offenen Leserahmen (ORF) die Funktion einer DXS zugeordnet werden kann:

- E. coli* (EMBL Acc. No. U 82664, Bp 17765 bis 19627), *Haemophilus influenzae* (SwissProt Acc. No. P 45205), *Bacillus subtilis* (SwissProt Acc. No. P 54523), *Rhodobacter capsulatus* (SwissProt Acc. No. P 26242), *Synechocystis* sp. PCC6803 (Gen Bank Acc. No. D 90903), *Mycobacterium leprae* (Acc. No. P 46708), *Mycobacterium tuberculosis* (Acc. No. Z 96072), *Helicobacter pylori* (Acc. No. AE 000552), *Methanococcus jannaschii* (Acc. No. G 64384) und dem CLA 1 (oder Def) Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Gen Bank Acc. No. U 27099; Mandel et al. (1996) *The Plant Journal* 9, 649-658).

- Weitere Recherchen in Sequenzdatenbanken ergaben für die DXS-Proteine Homologien zu Transketolase-ähnlichen Enzymen (z. B. EC 2.2.1.1) und den E1-Proteinen aus dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH, EC 1.2.4.1) aus verschiedenen Organismen. Die DXS-Proteine sind jedoch in der Regel kleiner als bakterielle Transketolasen.

Die Nukleinsäure-Sequenzen bzw. Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase werden als "dxs" und die Aminosäuresequenzen bzw. Proteine mit der Funktion einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase als "DXS" bezeichnet.

- Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß Enzyme mit der Funktion einer DXS einen neuen, hochspezifischen Angriffspunkt für die Entwicklung pestizider, insbesondere herbizider oder antibiotisch wirksamer Verbindungen darstellen.

- Erfindungsgegenstand ist daher ein isoliertes Protein mit der Funktion einer DXS, oder ein aktives Fragment daraus, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DXS aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Methanococcus jannaschii* und *Arabidopsis thaliana*.

Erfindungsgegenstand ist auch die o. g. DXS zur Verwendung als Wirkort für Herbizide oder Antibiotika.

- Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in einer rekombinanten Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in eine für eine Wirtszelle geeignete Expressionskassette inseriert; die so erhaltene Expressionskassette in geeigneter Weise in einen für eine Wirtszelle geeigneten Vektor inseriert; eine geeignete Wirtszelle mit dem so erhaltenen Vektor transformiert; die so transformierte Wirtszelle in einem geeigneten Medium kultiviert; und das von besagter Wirtszelle produzierte Protein mit der Funktion einer DXS oder das aktive Fragment daraus in geeigneter Weise aus dem Kulturmedium und/oder der Wirtszelle isoliert.

- Die vorliegende Erfindung betrifft insofern die Herstellung gereinigter DXS auf gentechnischem Wege. Z. B. können zur Herstellung von rekombinanter DXS in einem Wirtsorganismus DXS-codierende DNA-Sequenzen in eine Expressionskassette kloniert werden, welche zur heterologen Expression des Strukturgens in dem ausgewählten Wirtsorganismus geeignet sind.

Hierfür sind beispielsweise folgende DXS-kodierenden DNA-Sequenzen geeignet:

- 65 mikrobielle oder pflanzliche dxs-cDNA, mit gängigen Methoden in ihrer Sequenz veränderte pflanzliche dxs-cDNA-Moleküle, aber auch synthetische DNA-Sequenzen, abgeleitet aus mikrobieller oder pflanzlicher dxs-cDNA, die die Expression einer aktiven DXS oder deren aktiver Fragmente ermöglichen, insbesondere die oben genannten DXS-codierenden Sequenzen aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Synechocystis* sp.

PCC6803, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus jannaschii* und *Arabidopsis thaliana*.

DXS-kodierende DNA-Sequenzen sind auch verwendbar als Selektionsmarker, wie z. B. als Herbizidresistenzmarker.

Die Einführung spezifischer regulatorischer Sequenzen in die Expressionskassette kann außerdem erwünscht sein, beispielsweise von Promotoren, Operatorsequenzen, Enhancern, Terminatoren, Signalsequenzen, 5'- und 3'-untranslatierter Sequenzen, oder Sequenzen kodierend für geeignete Fusionsproteine. Die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzen ist allgemein übliche Technik, die je nach Expressionsstrategie breit variieren kann.

Die resultierende dxs-Expressionskassette, versehen mit den notwendigen regulatorischen Elementen im passenden Leserahmen des dxs-Strukturgens, kann in einen Expressionsvektor, mit welchem der ausgewählte Wirtsorganismus transformiert werden kann, inseriert werden. Geeignete Expressionsstrategien zur Herstellung rekombinanter Proteine und entsprechende Expressionsvektoren sind allgemein bekannt für Wirtsorganismen wie beispielsweise *E. coli*, Hefen und Insektenzellen. Der durch stabile oder transiente Transformation mit der dxs-Expressionskassette erhaltene rekombinante Organismus kann zur Gewinnung von rekombinanter DXS in gereinigter oder partiell gereinigter Form oder von Zellfraktionen, enthaltend DXS dienen. Der rekombinante Organismus kann gegebenenfalls auch direkter Bestandteil, d. h. zellulärer Bestandteil eines analytischen Testsystems sein.

Unter dem Begriff "rekombinanter Organismus" ist insofern die Zelle eines durch in vitro veränderter oder integrierter DNA modifizierten Organismus zu verstehen, beispielsweise von rekombinanten Hefe-, Bakterien-, Algen, Insekten- oder Pflanzenzellen.

Ein bevorzugtes Expressionssystem ist z. B. die Verwendung von *E. coli* als Wirtsorganismus. Als Vektoren können alle Vektoren dienen, die über die geeigneten Expressionssignale, wie z. B. Promotoren und geeignete Selektionsmarker, wie z. B. Resistenzgene oder Gene, die eine Auxotrophie komplementieren, verfügen.

Gentechnisch hergestellte DXS kann mittels verschiedener Methoden gereinigt werden. Die Eignung einer Methode hängt jeweils vom verwendeten Wirtsorganismus, der Expressionsstrategie und anderen Faktoren ab, die einem in der Expression und Reinigung rekombinanter Proteine erfahrenen Fachmann bekannt sind. Zum Zweck der Reinigung kann das rekombinante Protein auch durch entsprechende Veränderung seiner Gen-Sequenz in der Expressionskassette mit Peptidsequenzen fusioniert werden. Bevorzugt sind als Fusionspartner Peptide oder Proteine zu verwenden, die als C- oder N-terminale Fusionen der rekombinanten DXS eine Affinität zu bestimmten Säulenmaterialien verleihen. Solche Fusionen dürfen die Funktion der DXS nicht beeinflussen oder müssen z. B. durch Einbau geeigneter Proteaseschnittstellen unter Rekonstitution der Funktion abspaltbar sein. Als Beispiele für Fusionspartner seien Oligohistidin-Tails, das Strep-Tag™ (Bionetra GmbH, Göttingen, BRD), die Glutathion-S-Transferase (GST) oder das Maltose-bindende Protein (MalE) genannt, ohne daß diese Anwendung auf die beispielhaft angegebenen Fusionspartner oder deren Fragmente beschränkt ist.

Die rekombinante oder gentechnische Herstellung und Reinigung der DXS ermöglicht z. B. die Verwendung von DXS in biochemischen Testsystemen zur Bestimmung der Enzymfunktion der DXS in Gegenwart von auszuprüfenden Testsubstanzen, insbesondere durch automatisiertes Prüfen (z. B. High Throughput Screening) von Testsubstanzen.

Die erfindungsgemäßen Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika von DXS-Proteinen auf. Dazu können z. B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, chromatographisches Verhalten, Konformation, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc. gehören, sowie auch physikalische Eigenschaften wie z. B. das elektrophoretische Laufverhalten, Ladung, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften etc.

Ein wichtiges Charakteristikum einer DXS ist z. B. ihre Fähigkeit zur Synthese von DXP unter Umsetzung von Pyruvat und GA3P. Diese Aktivität kann z. B. wie in Beispiel Nr. 4 beschrieben bestimmt werden.

Erfindungsgegenstand ist daher auch ein Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der DXS, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Aktivität der DXS zu einem direkt oder indirekt, qualitativ oder quantitativ meßbaren Signal führt, vorzugsweise indem man eine DXS mit geeigneten Substraten inkubiert und die enzymatische Aktivität der DXS in An- und Abwesenheit einer zu untersuchenden Testsubstanz bestimmt und vergleicht.

Erfindungsgegenstand ist daher auch ein Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der DXS, worin man die enzymatische Aktivität der DXS in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt; die enzymatische Aktivität der DXS in Anwesenheit besagter Testsubstanz bestimmt; und die ermittelten enzymatischen Aktivitäten miteinander vergleicht.

Erfindungsgegenstand ist daher auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung von Effektoren der DXS, vorzugsweise in einem automatisierten Testsystem, z. B. durch sog. "High-Throughput-Screening", z. B. unter Verwendung von Pipettierrobotern und/oder computergestützten Steuer- und Analysesystemen.

Das Verfahren ist geeignet, spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren, d. h. Effektoren der DXS aufzufinden, so daß u. a. Stoffe identifiziert werden können, welche eine potentielle herbizide bzw. wachstumshemmende aber auch wachstumsfördernde Wirkung besitzen. Die zu untersuchende chemische Verbindung wird dabei bevorzugt in Konzentrationen zwischen 10^{-9} M und 10^{-3} M, und besonders bevorzugt in Konzentrationen zwischen 10^{-7} M und 10^{-4} M eingesetzt.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DXS stehen eine Reihe von geeigneten Verfahren zur Verfügung, bei denen man die DXS in einem geeigneten Reaktionspuffer unter geeigneten Reaktionsbedingungen bezüglich Reaktionstemperatur und dem pH-Wert der Reaktion in Anwesenheit von 1,6-bisphosphat mit geeigneten Substraten, wie z. B. Pyruvat und GA3P, inkubiert.

Als bevorzugte Reaktionsbedingungen der DXS seien geeignete Reaktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen pH 3 und pH 11, sowie Reaktionstemperaturen zwischen 2°C und 60°C genannt.

Die Quantifizierung der Enzyminhibition oder Enzymaktivierung (d. h. der effektorischen Wirkung) kann durch einen einfachen Vergleich der katalytischen Aktivität der DXS in Abwesenheit und in Anwesenheit der zu untersuchenden Testsubstanz unter ansonsten identischen Testbedingungen geschehen. Zur Bestimmung der Aktivität der DXS können verschiedene biochemische Meß-Methoden eingesetzt werden, durch die entweder die Entstehung der Reaktionsprodukte der von der DXS katalysierten Reaktion, z. B. DXP, oder aber eine Abnahme der Konzentration der Enzymsubstrate der DXS, z. B. Pyruvat oder GA3P, gemessen werden, z. B. durch eine Endpunktbestimmung des DXP nach enzy-

matischer Umsetzung des Substrats Pyruvat und GA3P, die gegebenenfalls radioaktiv markiert oder mit anderen gängigen Markern versehen waren oder durch nachgeschaltete Reaktionen nachgewiesen werden können, z. B. durch gekoppelte enzymatische Reaktionen.

- Dem in der Durchführung von Enzymtests erfahrenen Fachmann stehen viele Standardmethoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zur Verfügung (s. z. B. Bergmeyer, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1 und 2, Verlag Chemie, Weinheim (1974), Sueltner, C. H., Experimentelle Enzymologie: Grundlagen für die Laborpraxis, Fischer Stuttgart (1990)).

- Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DXS kann z. B. erfolgen, indem man die DXS mit [2-¹⁴C]-Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des gebildeten [2-¹⁴C]-1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat nach Abtrennung von noch nicht umgesetzten [2-¹⁴C]-Pyruvat und GA3P qualitativ oder quantitativ bestimmt. Die Trennung des 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat von Pyruvat und GA3P kann z. B. an einer geeigneten stationären Phase unter Verwendung eines geeigneten Laufmittelgemischs z. B. durch Dünnschichtchromatographie oder durch HPLC erfolgen. Zur Verbesserung der Trennung von DXP, Pyruvat und GA3P können die im Reaktionsansatz enthaltenen Phosphorsäureester vor der chromatographischen Trennung z. B. durch Behandlung mit saurer oder alkalischer Phosphatase in die korrespondierenden Alkohole überführt werden. Bei der Aktivitätsbestimmung einer DXS können aber auch andere, radioaktiv markierte Substrate, wie z. B. [U-¹⁴C]-Pyruvat, ¹⁴C-markiertes GA3P, ³H-markiertes Pyruvat oder ³H-markiertes GA3P an Stelle von [2-¹⁴C]-Pyruvat und GA3P verwendet werden.

- Es ist weiterhin vorstellbar, radioaktiv markierte DXP-Derivate (z. B. ¹³C-, ¹⁴C- oder ³²P markiert u. a.), ausgehend von aufgereinigter DXS, herzustellen, um diese in Testsystemen einzusetzen. Radioaktiv markiertes DXP kann als spezifischer Metabolit zur Untersuchung von Folgeenzymen des 1-Desoxyxylulose-P-Weges eingesetzt werden und damit auch wiederum die Untersuchung von Effektoren ermöglichen. So könnte z. B. Die Bildung von ¹⁴C-IPP oder anderen ¹⁴C-Verbindungen nachgewiesen werden; jeglicher Effektor, der demnach die Umwandlung von ¹⁴C-DXP in IPP in vivo oder in vitro absenkt, kann wiederum als mögliches Herbizid/Antibiotikum des gesamten Weges angesehen werden.

- Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit [1-¹⁴C]-Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion freigesetzten ¹⁴CO₂ bestimmt.

- Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion noch nicht umgesetzten Pyruvats mit Hilfe des Enzyms Lactat Dehydrogenase zu Lactat umsetzt und die Abnahme der Konzentration des bei der Reaktion der Lactat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten reduzierten Nikotinamid-Dinukleotid (NADH) mit einem geeigneten Verfahren, z. B. photometrisch, bestimmt.

- Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion noch nicht umgesetzten GA3P mit Hilfe des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat umsetzt und die Zunahme der Konzentration der reduzierten Form des bei der Reaktion der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten Nikotinamid-Dinukleotids mit einem geeigneten Verfahren direkt, z. B. photometrisch, oder nach Kopplung mit der Reduktion von Tetrazoliumverbindungen, bestimmt.

- Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und entweder nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit oder in einem gekoppelten enzymatischen Testsystem kontinuierlich die Menge des bei der Reaktion freiwerdende CO₂ mit Hilfe des Enzyms Phosphoenolpyruvat Carboxylase zu Oxalacetat umsetzt und die Menge des so gebildeten Oxalacetats mit Hilfe des Enzyms Malat Dehydrogenase zu Malat umsetzt und die Abnahme der Konzentration des bei der Reaktion der Malat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten reduzierten Nikotinamid-Dinukleotid (NADH) mit einem geeigneten Verfahren, z. B. photometrisch, bestimmt.

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und die Teilreaktion der Dekarboxylierung von Pyruvat an die Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol koppelt.

- Die erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung der effektorischen Wirkung von Testsubstanzen können mit gereinigter DXS durchgeführt werden, aber auch mit ganzen Zellen eines rekombinanten Organismus, welcher die DXS rekombinant exprimiert, mit DXS-haltigen Extrakten aus diesem Organismus oder angereicherten DXS-haltigen Fraktionen aus diesem Organismus. Als bevorzugter rekombinanter Wirtsorganismus seien Bakterien-, Insekten- und Hefezellen genannt. Alternativ kann auch eine aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellkulturen isolierte DXS verwendet werden. Es ist bekannt, daß DXP zu DMAPP/IPP über eine Reihe von Zwischenschritten umgesetzt wird. Die Einzelheiten, also die entstehenden Folgeenzyme sind noch nicht analysiert worden. Es ist jedoch bekannt, daß die Umsetzung über Kinasen, Oxidoreduktasen, Isomerasen und Mutasen erfolgt. Insofern ist zu erwarten, daß die Folgeenzyme ebenfalls Wirkorte für Herbizide und Antibiotika darstellen und ebenfalls als Effektoren fungieren.

- Für verschiedene Anwendungen wie z. B. die Herstellung eines o.g. biochemischen Testsystems zur Bestimmung einer Proteinfunktion ist eine wesentliche Voraussetzung, daß das zu untersuchende Protein in funktionsfähigem Zustand und möglichst rein, d. h. frei von störenden Aktivitäten, gewonnen werden kann. Wie bei allen Zellproteinen kann dies im Falle der DXS dadurch geschehen, daß das Enzym mit Hilfe gängiger Verfahren der Proteinreinigung aus den Organismen oder Geweben isoliert wird. In der vorliegenden Erfindung ist dargelegt, daß eine funktionell intakte DXS isoliert werden kann, deren Sequenz beispielhaft für E. coli mit SEQ ID Nr. 1 angegeben ist und mit der Sequenz aus der EMBL Datenbank Acc. No. U 82664 übereinstimmt.

1 MSFDIAKYPT LALVSTQEL RLLPKESLPK LCDELRRYL SVSRSSGHF
 51 ASGLGTVELT VALHYVYNTF FDQLIWDVGH QAYPHKILTG RRDKIGTIRO
 101 KGGLHPPWR GESEYDVLSV GHSSTISAG IGIAVAAEKE GKNRRTVCVI
 151 GDGAITAGMA FEAMNHAGDI RPDMLVILND NEMSISENVG ALNNHLAQLL
 201 SGKLYSSLRE GGKKVFSGVP PIKELLKRTE EHIKGMVVPG TLFEELGFNY
 251 IGPVDGHDVL GLITTLKNMR DLKGPOFLHI MTKKGRGYEP AEKDPITFHA
 301 VPKFDPSSGC LPKSSGGLPS YSKIFGDWLC ETAAKDNKLM AITPAMREGS
 351 GMVEFSRKFP DRYFDVAIAE QHAVTFAAGL AIGGYKPIVA IYSTFLQRAY
 401 DQVLHDVAIQ KLPVLFAIDR AGIVGADGQT HQGAFDLSYL RCIPENVIMT
 451 PSDENECROM LYTGYHYNDG PSAVRYPRGN AVGVELTPLE KLPIGKGIVK
 501 RRGEKLAILN FGTLMPAAK VAESLNATLV DMRFVKPLDE ALILEMAASH
 551 EALVTVEENA IMGGAGSGVN EVLMAHRKPV PVLNIGLPDF FIPOGTQEEM
 601 RAEGLDAAG MEAKIKAWLA

Erfindungsgegenstand ist desweiteren die Verwendung eines Proteins mit der Funktion einer DXS oder ein aktives Fragment daraus zur Identifizierung von Effektoren der DXS.

Die Verwendung der DXS basiert im wesentlichen auf ihrer enzymatischen Aktivität. Die Bereitstellung funktionell intakter DXS ermöglicht sowohl in vitro (z. B. zellfreies Testsystem der DXS) als auch in vivo die Durchführung von biochemischen Reaktionen, beispielsweise in ein- oder mehrzelligen rekombinanten Organismen oder Zellkulturen, insbesondere Hefen, Bakterien, Algen, Insektenzellen oder Pflanzen.

Diese Reaktionen können einerseits zur Herstellung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) oder Folgeprodukten wie z. B. Thiamin, Pyridoxin und Isoprenoide (u. a. Carotinoide, Chlorophylle, Phytole, Lutein, Sterole, Ubichinone/Menachinone/Plastochinone, Dolichol, Naturkauschuk, Paclitaxe/Docetaxel (Handelsnamen Taxol/Taxotere) genutzt werden, andererseits können diese biochemischen Reaktionen dazu verwendet werden, um in einem Testsystem die Wirkung von chemischen Verbindungen oder heterogenen Stoffgemischen in bezug auf die Funktion der DXS zu bestimmen.

Desweiteren kann die gentechnisch hergestellte DXS beispielsweise auch verwendet werden, um die Raumstruktur des Enzyms aufzuklären. Zur Aufklärung der Raumstruktur können allgemein bekannte Verfahren, wie z. B. die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen oder NMR-Spektroskopie verwendet werden. Die Strukturinformationen über die DXS, können beispielsweise verwendet werden, um ein rationales Design von neuen Inhibitoren der DXS – und somit potentiellen Herbiziden – durchzuführen.

Erfindungsgegenstand sind auch Effektoren der DXS, identifizierbar durch ein erfindungsgemäßes Verfahren, Effektoren der DXS, die ein Strukturanaloges des Pyruvat, des GA3P oder des DXP sind, insbesondere antibiotisch, pestizid oder herbizid wirksame Effektoren der DXS sowie deren Verwendung als Pestizide, Herbizide oder Antibiotika.

In den nachfolgenden Beispielen, die der näheren Erläuterung der Erfindung dienen und die in keiner Weise eine Einschränkung bedeuten sollen, wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

Bakterienstämme und Plasmide

Escherichia coli K 12, W3110 Wildtyp-Stamm (erhältlich von Genetic Stock Center der Yale Universität, U.S.A.) wurde als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von chromosomaler DNA verwendet.

Zur Klonierung und Expression von *dxs* in *E. coli* DH5 (supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557–580) und *E. coli* JM 109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lacproAB) F' [traD36 proAB+ lac^q lacZ Δ M15]*) (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103–119) wurde der Plasmid pUCBM20 (Boehringer Mannheim, BRD) eingesetzt.

Klonierungstechniken

Zur Klonierung (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY), PCR-Amplifizierung (Mullis und Faloona, (1987) Meth. Enzymol. 155, 335–350) und Transformation von DNA (Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557–580) wurden im allgemeinen die in den Literaturstellen beschriebenen Standardtechniken verwendet.

Es ist zu erwarten, daß eine veränderte DXS-Aktivität, insbesondere eine Aktivitätserhöhung, zu einer verstärkten Bildung von DXP-Derivaten (z. B. Thiamin oder Pyridoxin) und isoprenoiden Substanzen führt. Hierzu zählen Carotinoide,

DXS ist sowohl von Interesse als Wirkort zur Hemmung der IPP-Synthese (Antiproliferative, Antiparasitika, Antipilze, Antibiotika). Erfindungsgegenstand ist aber auch eine Hemmung der DXS-Aktivität und die verstärkte Bildung von DXP-Derivaten wie Thiamin oder Pyridoxin (Vitamine B1 und B6), und vor allem von isoprenoiden Substanzen. Dazu sollen, in möglichst breitem Maße, namentlich aber nicht ausschließlich, beansprucht werden:

- 5 Carotinoide, Chlorophylle, Phytole, Lutein, Sterole, Ubichionine/Menachinone/Plastochinone, Dolichol, Naturkautschuk, Paclitaxel/Docetaxel (Handelsnamen Taxol/Taxotère), u. a. kommerziell interessante Verbindungen.

Beispiel 1

10 Isolierung und Klonierung des dxs-Gens aus E. coli

Das dxs-Gen wurde aus E. coli K12 Wildtyp-Stamm W 3110 mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der bekannten E. coli Genomsequenz U 82664 und dem folgenden Primer amplifiziert:

15 **DXSEC05: 5' CCGAATTCACRGCCCCTGATGAGTTTTGAT 3' (Bp 19636-19616)**

und

20 **DXSEC03: 5' TTGCATGCAGGAGTGGAGTAGGGATTATG 3' (Bp 17747-17769).**

Die PCR-Primern DXSEC05 und DXSEC03 enthalten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRI bzw. SphI.

Zur Durchführung der PCR wurden jeweils 100 pmol der Primer mit 1.6 ng chromosomaler DNA aus E. coli K-12 Wildtyp Stamm LJ 110 (W31 10) eingesetzt. Nach Denaturieren des DNA-Doppelstranges bei 95°C für 30 Sekunden, folgten 30 Zyklen von jeweils: annealing bei 60°C, Polymerisation bei 72°C und nachfolgender Denaturierung bei 95°C (1 min).

25 Die Sequenz des PCR-Produkts (SEQ ID Nr. 2) wurde mittels eines A.L.F. Systems (Pharmacia, Freiburg, BRD) bestimmt:

1. ATGAGTTTTG ATATCCCAA ATACCCGACC CTGGCACTGC CGACTCCAC
 51 CCAGGAGTTA CGACTGTTGC CGAAAGAGAG TTTACCGAAA CTCTGCGACG
 101 AACTGCGCCG CTATTTACTC GACAGCGTGA GCCGTTCCAG CGGGCACTTC
 151 GCCTCCGGGC TGGGCACGGT CGAACTGACC GTGGCGCTGC ACTATGTCTA
 201 CAACACCCCG TTTGACCAAT TGATTTGGGA TGTGGGGCAT CAGGCTTATC
 251 CGCATAAAAT TTTGACCGGA CGCCGCGACA AAATCGGCAC CATCCGTCAG
 301 AAAGGCGGTC TGCACCCGTT CCCGTGGCGC GGCAGAAAGCG AATATGACGT
 351 ATTAAGCGTC GGGCATTTCAT CAACCTCCAT CAGTGCCGGA ATTGGTATTG
 401 CGGTTGCTGC CGAAAAAGAA GGCAAAAATC GCCGCACCGT CTGTGTCATT
 451 GGCGATGGCG CGATTACCGC AGGCATGGCG TTTGAAGCGA TGAATCACGC
 501 GGGCGATATC CGTCCTGATA TGCTGGTGAT TCTCAACGAC AATGAAATGT
 551 CGATTTCCGA AAATGTGCGC GCGCTCAACA ACCATCTGGC ACAGCTGCTT
 601 TCCGGTAAGC TTTACTCTTC ACTGCGCGAA GGCGGGAAAA AAGTTTTCTC
 651 TGGCGTGCCG CCAATTAAAG AGCTGCTCAA ACGCACCGAA GAACATATTA
 701 AAGGCATGGT AGTGCCTGGC ACGTTGTTTG AAGAGCTGGG CTTTAACTAC
 751 ATCGGCCCGG TGGACGGTCA CGATGTGCTG GGGCTTATCA CCACGCTAAA
 801 GAACATGCGC GACCTGAAAG GCCCGCAGTT CCTGCATATC ATGACCAAAA
 851 AAGGTCGTGG TTATGAACCG GCAGAAAAAG ACCCGATCAC TTTCCACGCC
 901 GTGCCTAAAT TTGATCCCTC CAGCGGTTGT TTGCCGAAAA GTAGCGGCGG
 951 TTTGCCGAGC TATTCAAAAA TCTTTGGCGA CTGGTTGTGC GAAACGGCAG
 1001 CGAAAGACAA CAAGCTGATG GCGATTACTC CGGCGATGCG TGAAGGTTCC
 1051 GGCATGGTCG AGTTTTACAG TAAATTCCCG GATCGCTACT TCGACGTGGC
 1101 AATTGCCGAG CAACACGCGG TGACCTTTGC TCGGGGTCTG GCGATTGGTG
 1151 GGTACAAACC CATTGTGCGG ATTTACTCCA CTTTCCTGCA ACGCGCCTAT
 1201 GATCAGGTGC TGCATGACGT GGCATTCAA AAGCTTCCGG TCCTGTTCGC
 1251 CATCGACCGC GCGGGCATTG TTGGTGCTGA CGGTCAAACC CATCAGGGTG
 1301 CTTTTGATCT CTCTTACCTG CGCTGCATAC CGGAAATGGT CATTATGACC
 1351 CCGAGCGATG AAAACGAATG TCGCCAGATG CTCTATACCG GCTATCACTA
 1401 TAACGATGGC CCGTCAGCGG TCGCTACCC GCGTGGCAAC GCGGTCGGCG
 1451 TGGAAGTAC GCGCTGGAA AACTACCAA TTGGCAAAGG CATTGTGAAG
 1501 CGTCGTGGCG AGAACTGGC GATCCTTAAC TTTGGTACGC TGATGCCAGA
 1551 AGCGGCGAAA GTCGCCGAAT CGCTGAACGC CACGCTGGTC GATATGCGTT
 1601 TTGTGAAACC GCTTGATGAA GCGTTAATTC TGGAAATGGC CGCCAGCCAT
 1651 GAAGCGCTGG TCACCGTAGA AGAAAACGCC ATTATGGGCG GCGCAGGCAG
 1701 CGGCGTGAAC GAAGTGCTGA TGGCCCATCG TAAACCAGTA CCCGTGCTGA
 1751 ACATTGGCCT GCCGGACTTC TTTATTCCGC AAGGAACTCA GGAAGAAATG
 1801 CGCGCCGAAC TCGGCCTCGA TGCCGCTGGT ATGGAAGCCA AAATCAAGGC
 1851 CTGGCTGGCA TAA

Expression des dxs-Gens in E. coli JM 109

- 5 Das resultierende 1,9 kb PCR-Fragment mit einer 7 bp strangaufwärts gelegenen Ribosomen-Bindungsstelle (AGC) wurde isoliert und über die EcoRI- und SphI-Schnittstellen in den Plasmid pUCBM20 (Boehringer Mannheim, BRD) subkloniert. Nach Transformation in E. coli JM109, wurde die Integrität der Plasmide durch Restriktionsanalyse überprüft. Die Expression erfolgte durch den auf dem Plasmid gelegenen lac-Promoter.

10

Beispiel 3

Reinigung des Enzyms DXS aus rekombinanten E. coli JM 109 Zellen

- 15 E. coli JM109 Zellen, die das Plasmid pUCBM20 mit dem inserierten dxs-Gen enthielten, wurden in LB-Medium (insgesamt 9,6 Liter) mit Ampicillin (100 mg/l) bis zu einer optischen Dichte von 0,8 kultiviert und 4 h lang mit Isopropyl-beta-D-thiogalaktosid (IPTG) (0,4 mM) induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, mit 50 mM Tris/HCl, 1 mM Dithiothreitol, 0,5 mM Thiamindiphosphat, 5 mM MgCl₂, pH 7,5 (Puffer A) gewaschen, in Puffer A resuspendiert (2,5 ml/g Zellfeuchtgewicht), und durch 3 Passagen in einer French Press aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde die Zelldebris verworfen und dem Überstand (173 ml) zur Fällung der Proteine 225 g/l NH₄SO₄ bei 0°C zugesetzt.
- 20 Das Präzipitat wurde in Puffer A resuspendiert und ultrafiltriert.

Die Probe (63 ml) wurde anschließend auf eine Q-Sepharose HP-Säule (Pharmacia Biotech, Schweden) aufgetragen, mit Puffer A gewaschen, und mittels eines ansteigenden Salzgradienten (0–1 M NaCl in Puffer A) im Bereich zwischen 0,2 und 0,3 M NaCl eluiert.

- 25 Die Rohextrakte und (partiell) gereinigtes Enzym wurden mittels des unten beschriebenen Testverfahrens auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin untersucht, aus Pyruvat und GA3P DXP zu bilden. Bezogen auf die rekombinanten Zellen, konnte eine ca. 17-fache Anreicherung erzielt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1

30	Probe	DXS-Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
35	E. coli LJ 110	0,4
	E. coli JM 109/pUCBM20dxs - IPTG	12,2
40	E. coli JM 109/pUCBM20dxs + IPTG	51,6
45	DXS (angereichert)	850

45 Im Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophoresegele (SDS-PAGE) besitzt das gereinigte DXS-Protein ein apparentes Molekulargewicht von ca. 66 kDa (Fig. 3). Die Molmasse von 66 kD stimmt mit der aus der DNA-Sequenz erwarteten Molmasse von 67,6 kD überein.

50

SDS-PAGE

Beispiel 4

Enzymtest der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

55

Der Test der enzymatischen Aktivität der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase wurde in Gegenwart von 200 mM Natriumcitrat-Puffer, pH 6,0, 10 mM Pyruvat, 30 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat, 20 mM MgCl₂, 1,5 mM Thiamindiphosphat (THDP), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,4 mM Ethylenediamintetraacetat (EDTA), 1 µCi [2-¹⁴C]-Pyruvat und der zu untersuchenden Probe in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt.

- 60 Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 4 Stunden (h) bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20%iger Perchlorsäure (5 µl) gestoppt. Der Überstand wurde mit 5 molarer K₂CO₃ (8 µl) neutralisiert.

- Zu einem Aliquot von 5 µl des DXS-Reaktionsüberstandes wurden 15 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (1,5 µl, Boehringer Mannheim, Nr. 108138) hinzugefügt und 30 min lang bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt, DXP, wurde nach Dephosphorylierung durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase als 1-Desoxy-D-xylulose auf einer Aminex HPX-87H (300 × 7,8 cm) HPLC-Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD) nachgewiesen, indem die Lösung anschließend auf eine Aminex HPX-87H HPLC-Säule aufgetragen und mit 6 mM H₂SO₄ bei einer Temperatur von 65°C nach Herstellerangaben eluiert wurde.

Der Nachweis des DXP und der 1-Desoxy-D-xylulose erfolgte durch einen in Reihe geschlossenen UV-Monitor

(185 nm) und einen Radiomonitor (Gold LB506C). 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat wurde im Ausschlußvolumen der Säule. Die Konzentration und Signalpositionen wurden mittels chemisch synthetisierter Standards der jeweiligen 1-Desoxy-Xylulose-Derivate (von T. Begley, Cornell University, New York, USA) bestimmt.

1 Unit (U) der enzymatischen Aktivität der DXS wurde als die Bildung von 1 µmol/min DXP bei einer Temperatur von 30°C definiert.

Durch Dialyse gegen einen Puffer ohne Thiamindiphosphat (THDP) verlor das Enzym seine Aktivität. Die Aktivität konnte jedoch zu mehr als 50% rekonstituiert werden, wenn THDP hinzugefügt wurde. Das Enzym zeigte insofern eine reversible, Thiamindiphosphat-abhängige Aktivität.

Beispiel 5

Identifizierung des Reaktionsprodukts DXP

Pyruvat und GA3P wurden in Gegenwart von gereinigter DXS unter den in Beispiel 4 genannten Reaktionsbedingungen umgesetzt. Ein hochauflösendes ¹H-NMR-Spektrum bei 400.13 MHz bzw. ein ³¹P-NMR-Spektrum bei 161.97 MHz wurden an einem AMX-400 WB Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, BRD) aufgenommen und ergab für DXP: 5.47 (d, 1.9 Hz, 1H); 4.38 (td, 6.5 Hz, 1.9 Hz, 1H); 3.90 (dd, 6.5 Hz, 7.3 Hz, 2H); 2.34 (s, 3H).

Diese Ergebnisse stimmten mit den NMR-Daten von chemisch synthetisiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) überein.

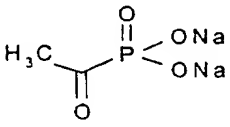
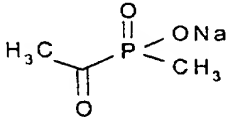
Beispiel 6

Inhibition der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

Die gemäß Beispiel 3 gereinigte DXS (von T. Begley, Cornell University, New York, USA) wurde auf seine in vitro Aktivität wie in Beispiel 4 beschrieben getestet. Die gemessene relative Aktivität des Ansatzes in Abwesenheit von Testsubstanzen wurde in Gegenwart von 1, 2 und 10 mM Pyruvat mit 100% festgelegt. Nach Zusatz des Pyruvatanalogen (jeweils 10 mM) wurde die verbliebene Aktivität der DXS in Gegenwart des Kompetitors ermittelt (Tabelle 2).

Tabelle 2

Inhibition der DXS durch Strukturanalogue des Pyruvat

DXS-Aktivität [%]			
		mit Effektor (10 mM)	
		Nr. 1	Nr. 2
Pyruvat (mM)	ohne Inhibitor		
10	100	96	45
2	100	95	9
1	100	103	6

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Hoechst Schering AgrEvo GmbH
 (B) STRASSE: -
 (C) ORT: Frankfurt
 (D) BUNDESLAND: -
 (E) LAND: Deutschland
 (F) POSTLEITZAHL: 65926
 (G) TELEPHON: 069-305-7427
 (H) TELEFAX: 069-305-2200
 (I) TELEX: -

(ii) ANMELDETITEL: 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase,
 Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der
 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und Effektoren der
 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 620 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..620

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
 1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60

DE 197 52 700 A 1

Tyr	Val	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Trp	Asp	Val	Gly	His	
65					70					75					80	
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly	
				85					90					95		
Thr	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Gly	Glu	
			100					105					110			
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	
		115					120					125				
Ala	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg	
	130					135					140					
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	
145					150					155					160	
Phe	Glu	Ala	Met	Asn	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Val	
				165					170					175		
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	
			180					185					190			
Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu	
		195					200					205				
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu	
	210					215					220					
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Glu	Glu	His	Ile	Lys	Gly	Met	Val	Val	Pro	Gly	
225					230					235					240	
Thr	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	
				245					250					255		
His	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu	
			260					265					270			
Lys	Gly	Pro	Gln	Phe	Leu	His	Ile	Met	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	
		275					280					285				
Glu	Pro	Ala	Glu	Lys	Asp	Pro	Ile	Thr	Phe	His	Ala	Val	Pro	Lys	Phe	
	290					295					300					
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Cys	Leu	Pro	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	
305					310					315					320	
Tyr	Ser	Lys	Ile	Phe	Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Thr	Ala	Ala	Lys	Asp	
				325					330					335		
Asn	Lys	Leu	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Met	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Met	
			340					345					350			
Val	Glu	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Pro	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Ala	Ile	
		355					360					365				

DE 197 52 700 A 1

Ala Glu His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
610 615 620

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..29

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CCGAATTCAC GCCCCTGATG AGTTTGTAT

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..29

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTGCATGCAG GAGTGGAGTA GGGATTATG

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1863 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..1863

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGAGTTTTG ATATTGCCAA ATACCCGACC CTGGCACTGG TCGACTCCAC CCAGGAGTTA
CGACTGTTGC CGAAAGAGAG TTTACCGAAA CTCTGCGACG AACTGCGCCG CTATTACTC
GACAGCGTGA GCCGTTCCAG CGGGCACTTC GCCTCCGGGC TGGGCACGGT CGAACTGACC

GTGGCGCTGC ACTA CTA CAACACCCCG TTTGACCAAT TGAT GGA TGTGGGGCAT 240
 CAGGCTTATC CGCATAAAAT TTTGACCGGA CGCCGCGACA AAATCGGCAC CATCCGTCAG 300
 5 AAAGGCGGTC TGCACCCGTT CCCGTGGCGC GGCAGAAAGCG AATATGACGT ATTAAGCGTC 360
 GGGCATTTCAT CAACCTCCAT CAGTGCCGGA ATTGGTATTG CGGTTGCTGC CGAAAAAGAA 420
 10 GGCAAAAATC GCCGCACCGT CTGTGTCATT GGCATGGCG CGATTACCGC AGGCATGGCG 480
 TTTGAAGCGA TGAATCACGC GGGCGATATC CGTCCTGATA TGCTGGTGAT TCTCAACGAC 540
 15 AATGAAATGT CGATTTCGA AAATGTCGGC GCGCTCAACA ACCATCTGGC ACAGCTGCTT 600
 TCCGGTAAGC TTTACTCTTC ACTGCGCGAA GCGGGGAAAA AAGTTTTCTC TGGCGTGCCG 660
 20 CCAATTAAAG AGCTGCTCAA ACGCACCAGAA GAACATATTA AAGGCATGGT AGTGCCTGGC 720
 ACGTTGTTTG AAGAGCTGGG CTTTAACTAC ATCGGCCCGG TGGACGGTCA CGATGTGCTG 780
 GGGCTTATCA CCACGCTAAA GAACATGCGC GACCTGAAAG GCCCGCAGTT CCTGCATATC 840
 25 ATGACCAAAA AAGGTCGTGG TTATGAACCG GCAGAAAAAG ACCCGATCAC TTTCCACGCC 900
 GTGCCTAAAT TTGATCCCTC CAGCGGTTGT TTGCCGAAAA GTAGCGGCGG TTTGCCGAGC 960
 30 TATCAAAAA TCTTTGGCGA CTGGTTGTGC GAAACGGCAG CGAAAGACAA CAAGCTGATG 1020
 GCGATTACTC CGGCGATGCG TGAAGGTTCC GGCATGGTCG AGTTTTACG TAAATTCCCG 1080
 35 GATCGCTACT TCGACGTGGC AATTGCCGAG CAACACGCGG TGACCTTTGC TCGGGGTCTG 1140
 GCGATTGGTG GGTACAAACC CATTGTCGCG ATTTACTCCA CTTTCCTGCA ACGCGCCTAT 1200
 GATCAGGTGC TGCATGACGT GCGATTCAA AAGCTTCGG TCCTGTTCGC CATCGACCGC 1260
 40 GCGGGCATTG TTGGTGCTGA CGGTCAAACC CATCAGGTG CTTTTGATCT CTCTTACCTG 1320
 CGCTGCATAC CGGAAATGGT CATTATGACC CCGAGCGATG AAAACGAATG TCGCCAGATG 1380
 45 CTCTATACCG GCTATCACTA TAACGATGGC CCGTCAGCGG TGCGCTACCC GCGTGGCAAC 1440
 GCGGTGCGCG TGGAAGTAC GCCGCTGGAA AACTACCAA TTGGCAAAGG CATTGTGAAG 1500
 50 CGTCGTGGCG AGAAACTGGC GATCCTTAAC TTTGGTACGC TGATGCCAGA AGCGGCGAAA 1560
 GTCGCCGAAT CGCTGAACGC CACGCTGGTC GATATGCGTT TTGTGAAACC GCTTGATGAA 1620
 GCGTTAATTC TGGAAATGGC CGCCAGCCAT GAAGCGCTGG TCACCGTAGA AGAAAACGCC 1680
 55 ATTATGGGCG GCGCAGGCAG CGGCGTGAAC GAAGTGCTGA TGGCCCATCG TAAACCAGTA 1740
 CCCGTGCTGA ACATTGGCCT GCCGGAATTC TTTATTCCGC AAGGAACTCA GGAAGAAATG 1800
 60 CGCGCCGAAC TCGGCCTCGA TGCCGCTGGT ATGGAAGCCA AAATCAAGGC CTGGCTGGCA 1860
 TAA 1863

65

1. Isoliertes Protein, **gekennzeichnet durch** die Funktion einer DXS oder ein aktives Fragment daraus.
2. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in einer rekombinanten Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in eine für eine Wirtszelle geeignete Expressionskassette inseriert;
 - b) die so erhaltene Expressionskassette in geeigneter Weise in einen für die Wirtszelle geeigneten Vektor inseriert;
 - c) eine geeignete Wirtszelle mit dem so erhaltenen Vektor transformiert;
 - d) die so transformierte Wirtszelle in einem geeigneten Medium kultiviert; und
 - e) das von besagter Wirtszelle produzierte Protein mit der Funktion einer DXS oder das aktive Fragment daraus in geeigneter Weise aus dem Kulturmedium oder der Wirtszelle isoliert.
3. Isoliertes Protein mit der Funktion einer DXS oder ein aktives Fragment daraus, herstellbar nach einem Verfahren gemäß Anspruch 2.
4. Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der DXS, worin man
 - a) die enzymatische Aktivität der DXS in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt;
 - b) die enzymatische Aktivität der DXS in Anwesenheit besagter Testsubstanz bestimmt; und
 - c) die unter a) und b) ermittelten enzymatischen Aktivitäten miteinander vergleicht.
5. Verwendung eines Proteins mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus zur Identifizierung von Effektoren der DXS.
6. Verwendung eines Verfahrens gemäß Anspruch 4 zur Identifizierung von Effektoren der DXS.
7. Verwendung gemäß Anspruch 6 in einem automatisierten Testsystem.
8. Effektor der DXS, identifizierbar durch ein Verfahren gemäß Anspruch 4.
9. Effektor der DXS, der ein Strukturanaloges des Pyruvats, des GA3P oder des DXP ist.
10. Pestizid wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 und 9.
11. Antibakteriell wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 und 9.
12. Herbizid wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 und 9.
13. Verwendung eines Effektors gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 12 als Pestizid, Herbizid oder Antibiotikum.

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)